

Bacillus licheniformis SCD121067 균체 생산성 증가를 위한 통계적 생산배지 및 발효조건 최적화

정유민 · 이주희 · 정혜종 · 전계택¹ · 윤순일 · 정용섭*

전북대학교 식품공학과, ¹강원대학교 생명과학과

Optimization of Medium and Fermentation Conditions for Mass Production of *Bacillus licheniformis* SCD121067 by Statistical Experimental Design

Yoo-Min Jeong, Ju-Hee Lee, Hea-Jong Chung, Gie-Taek Chun¹, Soon-Il Yun, and Yong-Seob Jeong*

Dept. of Food science & Technology, Chonbuk National University, Jeonbuk 561-756, Korea

¹Division of Life Science, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

Abstract In this work, mass production of *Bacillus licheniformis* SCD121067 through medium optimization by statistical experimental method was studied. First, galactose, yeast extract and potassium phosphate dibasic were selected as carbon, nitrogen and phosphate sources for mass production of *B. licheniformis* SCD121067 by using one factor at a time method. Second, according to the result of Plackett-Burman experimental design, key factors was yeast extract and K₂HPO₄. Finally, the response surface methodology was performed to obtain the optimum concentrations of two selected variables. The optimized medium composition consisted of 20 g/L galactose, 36 g/L yeast extract, 0.41 g/L K₂HPO₄, 0.25 g/L Na₂CO₃, 0.4g/L MgSO₄ and 0.01g/L CaCl₂. Dry cell weight (15.4 g/L) by optimum production medium were increased 10 times, as compared to that determined with basic production medium (1.5 g/L). Fermentation conditions were examined for the mass production of *B. licheniformis*. The effect of temperature, agitation speed, pH and aeration rate on the mass production of *B. licheniformis* were also studied in a batch fermenter which was carried out in a 2.5 L bioreactor with a working volume of 1.5 L containing optimized production medium. As a result, dry cell weight of batch culture was 30.7 g/L at 42°C, 300 rpm, pH 8.0 and 2 vvm.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, fermentation, statistical experimental design

서 론

*Bacillus*속은 α -amylase와 protease같은 상업적으로 중요한 효소를 생산하는 균으로 널리 알려져 있으며 이러한 효소 생산의 특성은 많이 연구되었다 [1-4]. 특히 발효과정 중 메주나 국 중에 생육하는 *Bacillus*와 *Aspergillus*가 생성하는 protease, amylase등의 효소작용으로 아미노산, 당분 등이 생

성되어 식염의 짠맛과 조화를 이루고 향미성분이 생성되어 독특한 향과 감칠맛을 낸다 [5-6]. 그중 메주의 내부에는 메주콩 혹은 환경조건 자체에서 유래되는 고초균 (*Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* 등)을 포함한 *Bacillus*속 세균이 주로 증식하면서 독특한 냄새를 발생하고 단백질 분해효소 등 각종 효소를 생성하여 메주의 주도적인 발열반응의 후기발효를 행하는데, 이들 발효균이 전통장류의 독특한 맛과 향을 좌우하는 주도적인 역할을 담당한다. 따라서 “메주의 역사는 곧 장 (醬)의 역사이다”라고 할 만큼, 우리나라 전통메주는 대대로 내려온 조선 장류 제조를 위해 중요한 발효원 (starter cake)으로 사용되어 왔으

*Corresponding author

Tel: +82-63-270-2571, Fax: +82-63-270-2572

e-mail: ysjjeong@jbnu.ac.kr

며, 그 품질이 전통 장류의 맛과 위생적인 품질지표를 결정하는 중요한 콩 발효식품 소재가 된다 [7]. 자연 발효한 것과 같은 품질의 매주를 대량으로 얻기 위해서 발효의 중요한 요소가 되는 미생물을 starter로 만들어 매주에 접종하면, 매주를 자연적으로 발효시키는데 필요한 긴 시간을 단축시킬 수 있다. 또한 건강에 대한 관심의 증대로 생리활성 효능의 기능성식품 시장이 급성장하고 있는 가운데, 강력한 생리활성 효과를 갖는 starter 미생물의 대량 생산기술 개발은 새로운 효능 제품의 내수시장 확대와 수출을 통해 수천억 규모의 고부가가치 기능성식품의 세계시장으로도 진출할 수 있을 것으로 기대한다.

*Bacillus cereus*는 식품에 존재할 때 독소를 생성하여 식중독을 유발하기 때문에 된장과 고추장, 춘장, 청국장, 혼합장 등 장류식품에서는 10^4 이하로 검출되도록 기준규격이 설정되어 있다. *Bacillus licheniformis* SCD121067는 일반적인 *Bacillus*속의 특성을 가지고 있을 뿐 아니라 발효식품에서 문제가 되는 식중독균인 *Bacillus cereus* 성장에 대한 억제효과가 높아서 안전성이 높은 발효식품을 생산할 수 있다.

B. licheniformis SCD121067이 산업에 이용되기 위해서는 대량생산을 위한 최적배지 조성의 확립과 손쉬운 배양 조건이 필수적이다 [8]. 배지성분은 균체 생산성에 직결되며 각 배지 성분의 농도도 매우 밀접한 관련이 있다. 배지 조성에 대한 최적 조건을 결정하기 위한 지금까지의 대부분의 연구는 하나의 배지성분을 여러 수준으로 놓고 나머지 배지성분들의 농도는 고정시켜 실험하는 방법을 주로 이용해 왔다 [9-13]. 이 방법은 주어진 조건에서 특정 성분의 영향을 파악할 수 있다는 장점이 있지만, 다른 성분들의 조건이 동시에 변하면 그 결과를 예측하기 어렵다. 특히 배지성분들 간의 상호작용이 존재할 경우 얻어진 결과가 요소만의 단독 효과인지, 또는 다른 요소와의 상호작용에 의한 효과인지를 구분할 수 없게 된다. 무엇보다도 이 방법의 가장 큰 문제점은 최대 생산성을 갖는 최적의 배지조성을 찾기가 매우 어렵다는 점이다.

이러한 문제점을 극복하기 위해 본 연구에서는 통계적 배지 최적화 방법을 도입하였다. 즉 생산배지의 조성을 최적화하기 위해 균체의 생산성에 큰 영향을 미치는 주요 배지성분들을 우선 찾아내고, 그 성분들의 교호작용을 확인하기 위해 다양한 통계적 방법을 순차적으로 적용한 후, 어떠한 배지 조성에서 균체량이 최대인지 반응표면분석법을 적용하여 최종 조사하였다 [14-16]. 그리고, 균체 대량생산을 위해 발효 최적조건을 확립하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 균주보관

본 연구에 사용된 균주는 순창 장류연구센터에서 *B. cereus*

에 대해 항균활성이 좋은 균주로 선별된 *Bacillus licheniformis* SCD121067를 사용하였다. 균주보관은 TSB (tryptic soy broth)에 접종하여 15시간 30°C에서 배양한 후 15% glycerol이 함유된 증류수로 -80°C deep freezer에 냉동 보관하여 필요시마다 해동하여 사용하였다.

배지 및 배양 조건

성장배양은 TSB에 균을 접종 후 30°C에서 15시간 배양하여 seed로 사용하였고, 생산배지에 1% (v/v)의 부피로 접종한 후 이를 진탕배양기에서 30°C, 110 rpm으로 24시간 동안 배양하였다. 배지를 최적화하기 이전의 기본생산 배지는 다음과 같다: Sucrose 20 g/L, Asparagine 10 g/L, Na₂HPO₄ 2 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g/L, Na₂CO₃ 0.25 g/L, CaCl₂ 0.01 g/L. 습식멸균 시 침전과 갈변현상을 방지하기 위하여 배지의 당과 무기염류는 각각 분리하여 농축용액으로 만들어 멸균한 뒤 무균상태에서 나머지 배지용액과 혼합하여 사용하였다.

최적 배지성분 결정과 통계적 배지농도 최적화

통계적 배지 최적화 방법을 수행하기 전에 우선적으로 하나의 요인을 제외한 나머지 요인들을 고정시켜 실험하는 “one factor at a time (OFAT) method”에 의해 다양한 배지 성분이 *Bacillus licheniformis* SCD121067 균체의 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 앞서 진행된 OFAT 실험의 결과에 따라 선별된 각각의 영양원이 균체 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Plackett-Burman design을 수행하고, 각 변수간의 상호작용의 정도를 확인하는 통계적인 방법인 full or fractional factorial design (FFD) 방법을 이용해서 균체생산성 증가에 효과를 보이는 최적의 배지 성분을 선정하는 과정을 거쳤다 [17]. 이 FFD의 실험에 의해 선별된 배지성분을 이용해서 곧바로 각 배지성분의 최적 농도를 선정하기 위한 반응표면분석법 (response surface method, RSM)을 실행할 경우, 어느 정도의 농도 범위에서 최적의 농도가 존재하는지를 추정하기가 매우 어려운 문제점이 존재한다. 따라서 최종적인 RSM 실험을 수행하기 전에 최적농도가 존재하는 근사치를 추정하기 위해서 최급상승법 (steepest ascent method, SAM)을 이용한 실험을 먼저 수행하였다 [18]. 그 후 선별된 배지성분의 최적 농도를 최종적으로 결정하기 위해 배지성분 각각의 농도 변화가 균체 생산성에 미치는 영향을 반응표면분석법을 이용하여 통계적으로 분석하였다. 이를 위한 실험계획법으로 중심합성계획법 (central composite design, CCD)을 이용하였다. 여기서 얻은 배양 결과를 Desing Expert pro 7.0 (statease, USA)을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 배지성분들에 대한 상호영향을 분석하고, 이 결과를 바탕으로 최고 균체생산을 위한 각 배지성분의 최적농도를 결정하였다.

발효조건 최적화

2.5 L 부피의 발효조 (Kobio Tech Co. Ltd.)에서 조업부피를 1.5 L로 하였다. pH, 배양온도, 공기유속과 교반속도는 각각 5.5~8.5, 32~47°C, 1~3 vvm (volume of air/volume of fluid/min)과 200~400 rpm의 범위 안에서 요인을 하나씩 변경시키며 최적조건을 찾는 실험을 진행하였다. 거품을 제거하기 위해 소포제를 사용하고, 발효 중 증발로 인한 배지의 감소를 막기 위해서 습윤기를 공기 공급라인에 설치하여 공급되는 공기 중의 수분함량이 포화상태에서 발효조로 공급하였다. 균체는 3% (v/v)의 비율로 발효조에 접종하여 배양하였다.

분석방법

건조균체량 (Dry cell weight, D.C.W)

건조균체량은 원심분리기로 균체를 분리시켜 105°C로 유지된 건조기에서 항량이 될 때까지 건조하여 질량을 측정할 값과 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정한 값으로 표준곡선식을 수립하였다. 발효액의 건조균체량은 측정된 흡광도 값을 표준곡선식에 대입하여 계산하였다.

Protease 측정

0.6% casein용액 3 mL과 시료 1mL을 혼합하여 37°C에서 30분간 방치하였다. 그리고 0.4M TCA용액 5 mL을 넣고 30°C에서 10분간 정치시킨 후 여과지를 이용하여 여과하였다. 여액 2 mL과 0.4M Na₂CO₃용액 5 mL과 folin 시약 1 mL을 혼합하여 30°C에서 30분간 정치한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 흡광도 값을 표준곡선식에 대입하여 protease 함량을 계산하였다. 시료를 0.6% casein에 30분간 반응시킨 후 생성되는 tyrosine의 μg 수를 1 unit으로 나타내었다 [19].

Bacillus cereus 항균활성

Bacillus cereus 항균활성은 30°C와 200 rpm의 조건에서 15시간 배양한 각각의 *Bacillus* 배양액에 10분 동안 정치한 punch paper를 *B. cereus*가 도말된 고체배지에 놓고 30°C에서 24시간 배양하여 punch paper 주변에 생성된 환의 직경을 측정하여 결정하였다.

Galactose 분석

Galactose를 분석하기 위하여 Dubois 방법을 보완한 phenol sulfuric acid 법을 사용하였다 [20]. 적당량 희석한 시료 1 mL에 5% phenol 1 mL과 sulfuric acid 5 mL을 넣고 반응시킨 후 상온에서 2시간 정치하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 표준곡선식에 대입하여 galactose 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

Bacillus cereus 항균활성

Bacillus licheniformis SCD121067 균주의 식중독균 *B. cereus*에 대한 항균 능력을 평가하였다. 그리고 상대적인 항균활성 능력을 비교하기 위해서 장류를 생산하는 공장에서 사용되고 있는 *Bacillus subtilis* (Daesang, Co. Ltd)과 부산대학교 식품영양학과에서 제공한 청국장에서 분리한 균인 *Bacillus subtilis* (Busan Univ., 박건영교수 실험실)를 사용하였다 (Fig. 1). 예상한 바와 같이 *Bacillus licheniformis* SCD121067는 지름 1.4 cm의 환을 생성하여 항균활성이 있는 것이 확인되었고, 장류를 생산하는 공장에서 사용되고 있는 *Bacillus subtilis* (Daesang, Co. Ltd)은 0.9 cm로 상당히 미약한 것을 알 수 있었다. 그리고 청국장에서 분리한 균인 *Bacillus subtilis* (Busan Univ.)에서는 환을 확인할 수가 없었다. 이 결과를 토대로 본 연구에서 실험한 2종의 *Bacillus subtilis*보다 *Bacillus licheniformis* SCD121067가 *B. cereus*에 대한 항균능력이 우수하다고 판단할 수 있었으며, 장류 제조 시 스타터로 활용하기 위하여 *Bacillus licheniformis* SCD121067 균주에 대하여 배지최적화와 발효조건 최적화 실험을 수행하였다.

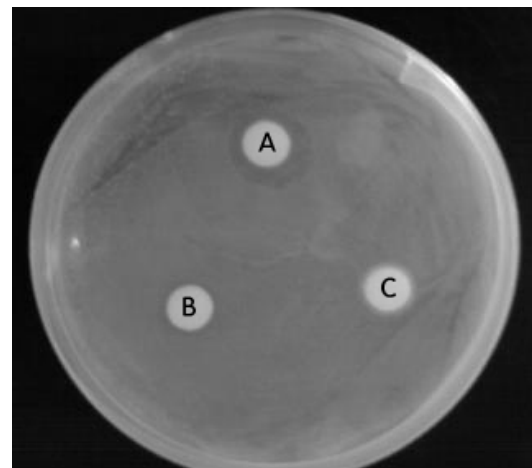


Fig. 1. Antibacterial activity of *B. subtilis* and *B. licheniformis* strains. (A: *Bacillus licheniformis* SCD121067, B: *Bacillus subtilis* (Daesang, Co. Ltd) C: *Bacillus subtilis* (Busan Univ.))

One factor at a time

액상 배양에서 *Bacillus licheniformis* SCD121067의 균체 성장에 효과적인 배지 성분을 선별하는 실험을 수행하였다. 탄소원 선정 실험에서 사용된 탄소원은 sucrose, glucose, galactose, lactose, fructose, maltose 였으며 이 중 galactose에서 균체량이 3.13 g/L로 가장 높게 측정되었다. 두 번째로 수행한 질소원 선정 실험에서는 asparagine, casitone, peptone, malt extract, yeast extract 그리고 proteose peptone을 사용

하였고, 여기서 균체량이 가장 높은 yeast extract (10.19 g/L) 를 질소원으로 선정하였다. 마지막으로 인원 선정 실험은 ammonium phosphate monobasic, potassium phosphate, potassium phosphate dibasic, disodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate dihydrate, diammonium hydrogen phosphate 총 여섯가지를 사용하였으며 potassium phosphate dibasic을 사용하였을 때 11.88 g/L로 가장 높아 인원으로 potassium phosphate dibasic (K₂HPO₄)을 선정하였다 (Fig. 2).

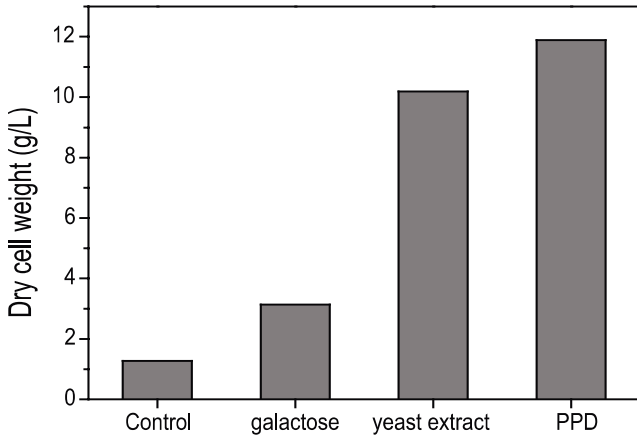


Fig. 2. The selected nutrient source for mass production of *Bacillus licheniformis* SCD121067 by using one factor at a time. Control (g/L): Sucrose (20), Asparagine (10), Na₂HPO₄ (2), MgSO₄ · 7H₂O (0.4), Na₂CO₃ (0.25), CaCl₂ (0.01), PPD: Potassium phosphate dibasic.

Plackett–Burman design을 통한 중요인자 선정

총 factor는 6가지로 하였다. 실험을 진행하기 위한 High (+)값과 Low (-)값의 설정은 농도가 높은 탄소원에서만 중심 값에서 20%로 조절하였고, 농도가 낮은 나머지 변수들은 50%로 조절하였다. Plackett-Burman design 결과 (Table 1)

Table 1. Plackett-Burman design for six variables

Trial	Variables						D.C.W (g/L)
	A	B	C	D	E	F	
M1	+	+	-	+	+	+	12.40
M2	-	+	+	-	+	+	13.05
M3	+	-	+	+	-	+	7.72
M4	-	+	-	+	+	-	15.99
M5	-	-	+	-	+	+	6.78
M6	-	-	-	+	-	+	5.55
M7	+	-	-	-	+	-	5.14
M8	+	+	-	-	-	+	8.34
M9	+	+	+	-	-	-	13.65
M10	-	+	+	+	-	-	13.05
M11	+	-	+	+	+	-	5.96
M12	-	-	-	-	-	-	2.71

A: galactose (+: 24, -: 16), B: yeast extract (+: 15, -: 5) C: K₂HPO₄ (+: 3, -: 1), D: CaCl₂ (+: 0.015, -: 0.005), E: MgSO₄ (+: 0.6, -: 0.2), F: Na₂CO₃ (+: 0.375, -: 0.125).

로 얻어진 Table 2을 통해 영향력이 클 수록 높게 계산되는 mean square값을 바탕으로 factor B, C 그리고 D를 선택 하였다. B (Yeast extract)는 질소원으로 Mean square값이 151.3로 가장 높았고, C (K₂HPO₄)는 인원으로 8.05 그리고 D (CaCl₂)는 10.08로 Mean square값이 두 번째로 높게 측정 되어 선정하였다.

Table 2. Analysis of the dry cell weight shown in table 1

	A	B	C	D	E	F
∑ (H)	53.2028	76.4723	60.2173	60.6663	59.3195	53.8388
∑ (L)	57.1310	33.8615	50.1165	49.6675	51.0143	56.4950
Difference	-3.9281	42.6107	10.1009	10.9987	8.3052	-2.6562
Effect	-0.6547	7.1018	1.6835	1.8331	1.3842	-0.4427
Mean square	1.2858	151.3063	8.5023	10.0810	5.7480	0.5879

Full factorial design을 통한 *B. licheniformis* SCD121067 생산 배지 영향

Plackett-Burman design을 통해 주요 요소로 선정된 yeast extract, K₂HPO₄ 그리고 CaCl₂를 세가지 factor로 각각의 농도를 다르게 하여 FFD를 수행한 결과 Table 3의 D.C.W 값과 Design Expert pro S/W를 통해 Table 4를 얻을 수 있었다.

Yeast extract와 CaCl₂의 main effect는 양 (+)의 값이므로 배지에 첨가되는 양이 많을수록, K₂HPO₄는 음 (-)의 값이므로 양이 적을수록 균체량이 높아지는 경향을 보임을 알 수 있다.

Table 3. Experimental matrix for 3-factor full factorial design (FFD) and D.C.W of *B. licheniformis* SCD121067

	A	B	C	D.C.W (g/L)
1	-1	-1	-1	10.6940
2	+1	-1	-1	13.2192
3	-1	+1	-1	8.87961
4	+1	+1	-1	11.9473
5	-1	-1	+1	10.6005
6	+1	+1	+1	13.3502
7	-1	-1	+1	8.91702
8	+1	+1	+1	12.2279
9	0	0	0	11.3487
10	0	0	0	11.5545

A: yeast extract (+: 15, 0: 10, -: 5), B: K₂HPO₄ (+: 3, 0: 2, -: 1), C: CaCl₂ (+: 0.015, 0: 0.01, -: 0.005).

Table 4. Experimental design for the optimization of D.C.W medium concentration through full factorial design (FFD)

	Yeast extract	K ₂ HPO ₄	CaCl ₂
center point	10	2	0.01
origin step	5	1	0.005
main effect	2.91	-1.47	0.09
coefficient	1.455	-0.735	0.045
r value	5.099		
slope value	4.549	-2.298	0.141
new step	22.748	-2.298	0.0007

Steepest ascent method을 통한 최적점에서의 최단 거리 확립

균체량이 최대가 되는 점을 찾기 위하여 각각의 요소를 r value/new step 값만큼 변화시켜 실험을 진행하였다. Yeast extract의 농도는 10을 중심으로 4.5씩 증가시키고, K₂HPO₄는 2를 중심으로 0.45씩 감소시켜 (Table 5) 균체량이 어느 지점에서 최대치를 주는지 알아보기 위하여 SAM을 진행하였다. CaCl₂는 변화값이 0.0001로 너무 작아서 SAM실험에서 제외하였다. Yeast extract의 농도가 27.8 g/L 그리고 K₂HPO₄의 농도가 0.2 g/L 일 때 균체량은 14.9 g/L로 가장 높았다. 2가지 배지성분 상호간의 영향을 조사한 상기의 FFD 실험결과에 근거해서 계산한 실험 설계값으로 RSM을 진행하였다.

Table 5. Run table for the D.C.W experiments design for SAM

No.	Yeast extract	K ₂ HPO ₄	D.C.W
1	10	2	13.85
2	14.5	1.5	14.19
3	19	1.1	14.17
4	23.4	0.65	14.12
5	27.8	0.2	14.90

반응표면분석법 (response surface method)을 통한 B. licheniformis SCD121067 배지 최적화

최종 선별된 배지성분의 최적 농도를 결정하기 위해 배지 성분 각각의 농도 변화가 B. licheniformis SCD121067의 생산성에 미치는 영향을 반응표면분석법을 이용하여 분석하였다.

K₂HPO₄와 yeast extract의 교호작용을 보았을 때 실험이 진행된 농도범위에서 yeast extract는 36 g/L에서 균체량이 높은 경향성을 보였지만, K₂HPO₄는 0.3 g/L 보다 농도를 높게 하거나 0.1 g/L보다 더 낮은 농도에서 균체량이 올라가는 경향을 보였기 때문에 (자료 미제시), Table 6으로 2차 RSM을 진행하였다. 각 배지조합과 그 배지조합에서 얻은 최종 D.C.W (g/L)을 Table 7에 제시하였다.

Fig. 3은 yeast extract와 K₂HPO₄의 반응표면을 나타낸 것이다. Yeast extract가 36 g/L, K₂HPO₄의 농도가 0.26 g/L일 때 D.C.W가 15.4 g/L로 최적점임을 알 수 있었다. 배지최적화 실험을 통한 최적배지의 농도는 galactose 20 g/L, yeast extract 36 g/L, K₂HPO₄ 0.26 g/L, Na₂CO₃ 0.25 g/L, MgSO₄ 0.4 g/L 그리고 CaCl₂ 0.01 g/L이다.

Table 6. Concentration of the respective medium components at each level (central composite design for the response surface method)

Xn	Independent variables	Level				
		-α	-1	0	+1	+α
X ₁	Yeast extract	25.68	27	36	45	46.32
X ₂	K ₂ HPO ₄	0.11	0.13	0.26	0.39	0.41

※ α: 1.147.

Table 7. CCD matrix of two variables with experimental and predicted values of D.C.W

Exp No.	Culture condition		D.C.W (g/L)	
	Yeast extract (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	Predicted value	Experimental value
1	-1 (27)	-1 (0.13)	14.72	14.95884
2	+1 (45)	-1 (0.13)	14.50	15.07108
3	-1 (27)	+1 (0.39)	14.31	13.89264
4	+1 (45)	+1 (0.39)	14.83	14.75309
5	-α (25.68)	0 (0.26)	13.89	14.60344
6	+α (46.32)	0 (0.26)	14.93	14.19193
7	0 (36)	-α (0.11)	14.37	14.43509
8	0 (36)	+α (0.41)	15.08	15.52
9	0 (36)	0 (0.26)	15.23	15.01496
10	0 (36)	0 (0.26)	15.23	15.46389
11	0 (36)	0 (0.26)	15.23	15.38907

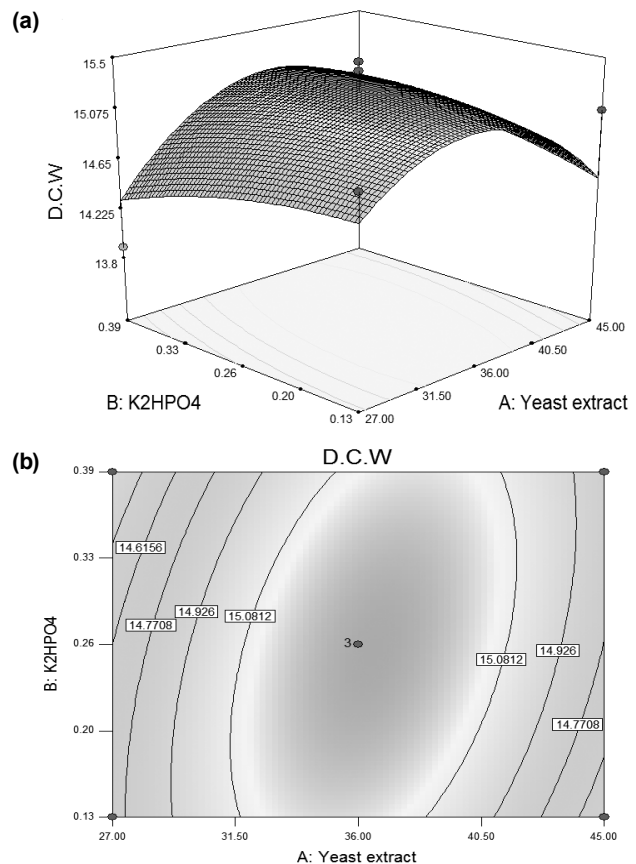


Fig. 3. D.C.W represents as (a) 3-D response surface and (b) contour plot as a function of the concentration of K₂HPO₄ and yeast extract.

발효조건 최적화와 회분식 배양

온도 조건을 다르게 하여 B. licheniformis SCD121067을 24시간 배양한 결과, 42°C에서 균체 성장량이 20.35 g/L로 가장 좋았고, 총 당 역시 3.2 g/L까지 떨어진 것을 확인하였다. 32°C와 37°C에서는 6시간이 지날 때 까지 균체량이 0에 가까웠지만 9시간이 지난 후부터 조금씩 성장하였다. 47°C의 조건

에서는 6시간까지 성장이 좋았지만 그 후에는 거의 자라지 않았다. 균체 성장이 가장 좋은 42°C를 제외한 나머지 온도에서는 galactose 역시 모두 소모되지 않았다 (자료 미제시).

이전실험에서 얻은 배양 최적온도 42°C에서 교반속도를 다르게 해서 실험을 수행하였을 때, 100 rpm과 200 rpm에서 각각의 균체량은 배양 24시간 후 14.5 g/L와 20.35 g/L에 그쳤지만 300 rpm에서는 배양 15시간 후 24 g/L까지 성장하였다 (자료 미제시).

42°C, 300 rpm의 배양조건을 고정시키고 pH를 6.0부터 8.5까지 변화시켜 실험을 진행한 결과, 6.0에서 7.5사이의 범위에서는 pH가 높아질수록 점점 균체량이 증가하는 경향을 보이다가 pH 8.0의 조건에서 가장 높은 25 g/L의 균체를 얻을 수 있었고, pH가 8.5로 더 높아지자 성장이 급격하게 저하되었다 (자료 미제시).

42°C, 300 rpm 그리고 pH 8.0의 조건에서 1, 2, 3 vvm으로 *B. licheniformis* SCD121067를 배양했을 때, 통기량이 높을수록 균체 성장이 높을 것이라는 예상과 달리 3 vvm에서는 균 성장에 저해를 받는 것을 알 수 있었다. 균체는 2 vvm에서 30.5 g/L까지 성장하였다 (자료 미제시).

배양 조건 최적화 실험으로 구한 42°C, 300 rpm, pH 8.0 그리고 2 vvm의 배양 조건에서 30.5 g/L의 최대 균체량을 얻을 수 있었으며, 시간에 따른 탄소원 galactose, 균체량과 용존산소의 변화를 나타내었다 (Fig. 4).

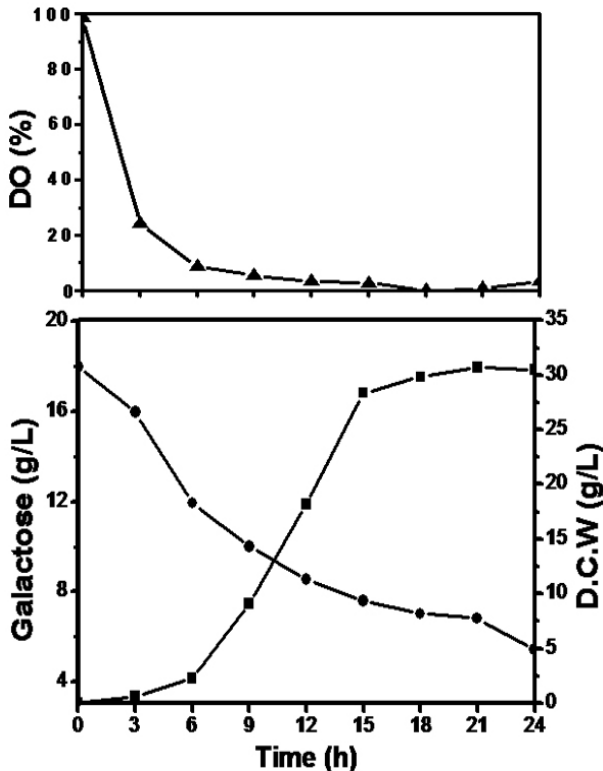


Fig. 4. Time profiles of residual galactose concentration (●), DO (▲) and D.C.W (■) in the batch culture at 42°C, 300 rpm, pH 8.0 and 2 vvm.

최적배지와 선택된 발효 조건을 이용한 반복회분배양

최적배지와 선택된 발효조건에서의 반복회분배양을 수행하여 결과를 나타내었다 (Fig. 5). 배양 24시간이 지난 후 균체는 26.2 g/L까지 성장하였으며, 이 때 남아있는 galactose의 양은 3.3 g/L이었다. 반복회분배양을 수행하기 위해, 발효액 90% (1.35 L)를 발효조로부터 제거하고 새로운 배지 1.35 L를 첨가하였다. 새로운 배지를 첨가한 후의 galactose의 농도는 약 17.5 g/L이었다. 새로운 배지를 첨가한 후 12시간동안 균체의 성장이 급격하게 일어나는 것을 알 수 있었다. 새로운 배지를 첨가한 두 번째와 세 번째도 비슷한 경향으로 균체 성장과 galactose 소모가 이루어지는 것을 측정할 수 있었다. 특히 네 번째 배양인 90시간에서의 균체량이 26.18 g/L로 배양 24시간 후인 26.2 g/L와 거의 비슷한 수준이었다. 세번의 반복배양을 수행한 결과, 반복회분배양 방법으로 균체생산을 하더라도 무리가 없는 것으로 판단되었다.

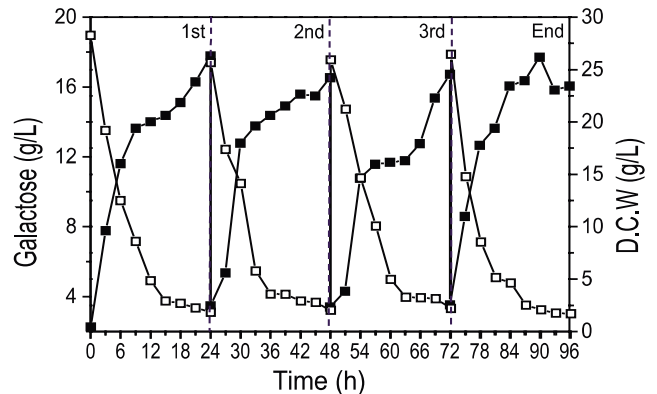


Fig. 5. Time profiles of D.C.W (■) and residual galactose concentration (□) during repeated-batch fermentation using the optimized medium at 42°C, 300 rpm, pH 8.0 and 2 vvm.

반복회분배양 한 후에 *B. cereus* 항균활성 능력을 측정 한 결과, 최대 1.8 cm의 환 또는 최소 1.5 cm의 환이 측정되었으며, 반복회분배양 하여도 항균활성이 줄어들지 않고 일정하게 유지되는 것을 확인하였다. Protease activity는 배양 24시간 후에 15.2 U/mL로 측정되었고, 48시간, 72시간 그리고 96시간에 각각 18.84 U/mL, 14.98 U/mL 그리고 17.62 U/mL였다. 효소 활성 역시 *B. cereus*에 대한 항균활성 능력과 마찬가지로 배양이 반복되어도 일정하게 유지된다는 것을 확인하였다 (Table 8). 이것으로 장시간 반복회분배양을 진행하여도 큰 무리가 없을 정도로 균의 안정성이 있는 것으로 판단되었다.

Table 8. The antibacterial effect against *B. cereus* and protease activity by *B. licheniformis* SCD121067 during the repeated-batch fermentation

	1st	2nd	3rd	4th
Diameter (cm)	1.8	1.5	1.7	1.6
Protease (U/mL)	15.2	18.84	14.98	17.62

결 론

Bacillus licheniformis SCD121067의 균체 대량생산을 위한 생산 발효공정을 통계적 방법을 적용하여 생산배지 조성 및 발효조에서의 물리적인 조건을 최적화 하는 연구를 수행하였다. 우선 one factor at a time (OFAT) 방법을 이용하여 탄소원, 질소원 그리고 인원을 각각 galactose, yeast extract 그리고 K_2HPO_4 로 선정하였고, plackett-Burman design을 통해 *Bacillus licheniformis* SCD121067 균체량 증가에 중요한 요인인 yeast extract, K_2HPO_4 그리고 $CaCl_2$ 를 찾을 수 있었다. 또한 Full factorial design (FFD) 실험을 통해 생산배지에 K_2HPO_4 가 과량 첨가되면 균체 생산성이 저해됨을 알 수 있었다. FFD의 1차 모델식을 근간으로 하여 최급상승법 (steepest ascent method, SAM)을 적용하여 yeast extract 그리고 K_2HPO_4 의 최적 농도로 향하는 가장 가까운 기울기를 구함으로써, 신속하고 효율적으로 최적 농도지점에 대한 정보를 얻을 수 있었다. SAM이 제시해주는 농도 부근에서 반응표면분석 (response surface design, RSM)을 적용하여 각 배지성분의 농도를 최적화시키기 위해, 2개의 중요한 요인인 yeast extract와 K_2HPO_4 를 이용하여 중심합성계획 (central composite design, CCD) 실험을 수행하였다. 그 결과 *Bacillus licheniformis* SCD121067에 균체량 생산의 최적 조건은 yeast extract 36 g/L, K_2HPO_4 0.26 g/L인 것으로 관찰되었고, 이 농도에서 균체량은 초기 사용된 배지에서의 생산성에 비해 약 10배 증가한 15.4 g/L로 나타났다. 배지최적화 연구를 통해 알아낸 최적배지를 이용하여 2.5 L 발효조에서의 발효 최적조건을 알아보는 실험을 진행한 결과 배양 온도, 교반속도, pH, 공기유속은 각각 42°C, 300 rpm, 8.0 and 2 vvm으로 측정되었고, 이때의 균체 생산량은 30.5 g/L였다. 그리고 최적화 된 배지와 발효조건을 이용하여 반복 회분배양을 실시하였을 때, 매 회의 회분배양마다 약 26~27 g/L의 D.C.W를 얻을 수 있었으며 효소와 *B. cereus*에 대한 항균활성 능력은 배양이 반복되어도 일정하게 유지된다는 것을 확인하였다.

접수 : 2010년 11월 26일, 게재승인 : 2010년 12월 24일

REFERENCES

1. Wanwisa, S., J. M. Scharer, P. L. Douglas, and M. Moo-Young (2004) Fed-batch optimization of α -amylase and protease-production *Bacillus subtilis* using markov chain method, *Biotechnol. and Bioeng.* 86: 706-717.
2. Ikram, ul-Haq, and H. Mukhtar (2006) Fuzzy logic control of bioreactor for enhanced biosynthesis of alkaline protease by an alkalophilic strain of *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbiol.* 52: 149-152.
3. Dutt, K., G. K. Meghwanshi, P. Gupta, and R. K. Saxena (2008) Role of casein on induction and enhancement of production of a bacterial milk clotting protease from an indigenously isolated *Bacillus subtilis*. *Lett. in Appl. Microbiol.* 46: 513-518.
4. Ashis, K., H. Mukherjee, Adhikaria, and S. K. Rai (2008) Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrica grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochem. Eng. J.* 39: 353-361.
5. Sandhya, C., A. Sumantha, G. Szakacs, and A. Pandey (2005) Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process. Biochem.* 40: 2689-2694.
6. Jeong, S. S., E. M. Han, and T. S. Lee. (1986) Effect of Meju shapes and strains on the chemical composition of soybean paste. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 15: 1-9.
7. http://www.reportnet.co.kr/knowledge/pop_preview.html?dn=2077514.(2003).
8. Jang, Y. M., W. S. Shin, D. H. Lee, S. Y. Kim, C. H. Park, Y. S. Jeong, and G. T. Chun (2009) Statistical optimization of production medium for enhanced production of itaconic acid biosynthesized by fungal cells of *Aspergillus terreus*. *KSBB J.* 24: 30-40.
9. Lee, S. H., S. B. Lee, H. G. Lee, and S. Y. Oh (2001) Experimental design methodology for quality improvement. Proceedings of Spring Symposium of Korean Operation Reserch and Management Science Society and Korean Institute of Industrial Engineers.
10. <http://www.cheric.org/ippage/p/ipdata/2000/14/%BD%C7%C7%E8%B8%B9%B9%FD.html>.
11. Koo, J. H., I. J. Choi, H. S. Nam, H. J. Lee, Z. I. Shin, and T. K. Oh (1997) Medium optimization for production of thermostable alkaline proteases from *Bacillus licheniformis* NS70. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 207-211.
12. Box, G. E. P. and J. S. Hounter (1957) Multifactor experimental design for exploring response surface. *Ann. Math. Stat.*, 28: 195-242.
13. Cochran, W. G. and G. M. Cox. (1957) Experimental design, pp. 335-375, John Wiley & Sons Inc., New York, U.S.A.
14. Shweta, S., A. Malik, and S. Satya (2009) Application of response surface methodology (RSM) for optimization of nutrient supplementation for Cr (VI) removal by *Aspergillus lentulus* AML05. *J. Hazard. Mater.* 164: 1198-1204.
15. Senthil Kumar, S. R., B. A. Kumar, K. C. Raj, and P. Gunasekaran (2005) Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. *Bioresour. Technol.* 96: 1380-1386.

16. Gonen, F. and Z. Aksu (2008) Use of Response Surface Methodology (RSM) in the evaluation of growth and copper (II) bioaccumulation properties of *Candida utilis* in molasses medium. *J. Hazard. Mater.* 154: 731-738.
17. Box, G. E. P. and J. S. Hunter (1978) Fractional factorial design at two levels. In: *Statistics for experimenters*. pp. 374-418, John Wiley & Sons, New York.
18. Kleijnen, J. P. C., D. Hertog, and E. Angun (2004) Response surface methodology's steepest ascent and step size revisited, *Eur. J. Operational Res.* 159: 121-131.
19. Kwan K. K. H., S. Nakai, and B. J. Skura (2006) Comparison of Four Methods for Determining Protease Activity in Milk. *J. of Food Sci.* 48: 1418-1421.
20. Kimberley, A. C. and C. Taylor (1995) A modification of the phenol/sulfuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbances. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 53: 207-214.